

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 813–815

Eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung der lang- und mittelkettigen freien Fettsäuren im Serum

Von P. Radermacher, H. Grote, F. Susanto und H. Reinauer

Lehrstuhl für Klinische Biochemie und Biochemische Abteilung des Diabetes-Forschungsinstituts, Düsseldorf

(Eingegangen am 22. März/20. Juli 1982)

Zusammenfassung: Die Konzentrationen der freien Fettsäuren im Serum werden nach Veresterung mit Bortrifluorid-Methanol gaschromatographisch bestimmt. Das beschriebene Analyseverfahren erfaßt nach dünn-schichtchromatographischer Vorreinigung der Serumlipidfraktionen selektiv die mittel- und langkettigen freien Fettsäuren. Das Analyseverfahren wurde auf Richtigkeit und Präzision überprüft und eignet sich zur Analyse der Fettsäurekinetik im Blut nach Lipidinfusionen.

A method for the gas chromatographic determination of long and medium chain free fatty acids in serum

Summary: Free fatty acids in serum were determined by gas chromatography after esterification with boron trifluoride-methanol. Following prepurification of the serum lipid fractions by thin layer chromatography, the described analytical procedure selectively determines the medium and long chain free fatty acids. Accuracy and precision were tested. The method is suitable for the analysis of fatty acid kinetics in blood, following lipid infusions.

Einführung

Im Rahmen von Infusionsversuchen mit Lipidemulsionen interessierte die Kinetik der freien Fettsäuren im Serum für die Beurteilung der intravasalen Lipolyse. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Lipidkomponenten – mittel- bzw. langkettige Triglyceride – in den infundierten Emulsionen war für unsere Fragestellung eine Meß- und Probenaufbereitungsmethode erforderlich, die auch die mittelkettigen freien Fettsäuren erfaßt. Arbeiten über die Analyse von langkettigen freien Fettsäuren und von Gesamtfettsäuren liegen vor (1–3). Ziel dieser Arbeit war es, ein Probenaufbereitungsverfahren aufzubauen, das selektiv neben den langkettigen auch die mittelkettigen freien Fettsäuren erfaßt.

Materialien und Analysengang

Alle Substanzen, soweit nicht anders vermerkt, waren von p.a. Reinheit und wurden von der Fa. Merck bezogen.

Extraktion der freien Fettsäuren

Zur Fällung der Proteine und zur Extraktion der freien Fettsäuren wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol, n-Heptan und 0,5 mol/l Schwefelsäure (Volumina,

200 ml + 50 ml + 5 ml) verwendet (4). Um die freien Fettsäuren möglichst quantitativ in die organische Phase zu überführen, wurde eine Natriumsulfat-gesättigte 1 mol/l Schwefelsäure zugesetzt.

Dünn-schichtchromatographie

Zur Vortrennung der Serumlipide wurden Kieselgel-60-DC-Platten der Fa. Merck verwendet, die mit Chloroform-Aceton (1 + 1) vorgereinigt waren. Bei der Auftrennung der Lipidfraktionen bestand das Fließmittel aus n-Hexan, Diethylether und Eisessig (Volumina, 60 ml + 40 ml + 1 ml).

Als Referenzsubstanzen wurden Arachidonsäure (Reinheitsgrad 90%), Linolsäure, Caprylsäure und Arachinsäure (alle Reinheitsgrad 99%), bezogen von den Firmen Serva (C_{20:4}, C_{18:2}) und Merck (C_{8:0}, C_{20:0}), verwendet, aufgetragen als Gemische von Linolsäure mit Arachinsäure und Caprylsäure mit Arachidonsäure.

Interner Standard

Als interner Standard wurde je 50 µg Nonansäure (Pelargonsäure C_{9:0}, Reinheitsgrad 99%) der Fa. Sigma und Heptadecansäure (Margarinsäure C_{17:0}, Reinheitsgrad 98%) der Fa. Merck verwendet. Die beiden Standards waren gaschromatographisch einheitlich.

Veresterung

Die freien Fettsäuren wurden mit 10% Bortrifluorid-Methanol (Bortrifluorid-Diethylether-Komplex in Methanol 20 + 80) nach Morrison verestert (5).

0340-076X/82/0020-0813\$02.00

© by Walter de Gruyter & Co. · Berlin · New York

Gaschromatographie

Die Fettsäuremethylester wurden mit einem Gaschromatographen L 350 der Fa. Siemens mit einem Flammenionisationsdetektor analysiert. Es wurde eine Glaskapillarsäule (49 m) der Fa. WGA (Beschichtung WG 11) verwendet. Die Detektortemperatur betrug 250 °C, das Trägergas war Helium bei einem Druck von 1,5 bar (Messer Griesheim, 6,0).

Probenvorbereitung

Von einer Lösung, die 0,5 g/l Pelargonsäure und 0,5 g/l Margarinsäure in n-Hexan enthält, werden 100 µl unter Stickstoffstrom zur Trockne gebracht, 1 ml Serum hinzugegeben und nach Durchmischen etwa 10 Stunden bei 4 °C gehalten. Zum Serum werden 5 ml der Extraktionslösung gegeben, nach Durchmischen 2 ml der mit Natriumsulfat gesättigten 1 mol/l Schwefelsäure und 5 ml n-Hexan hinzugefügt. Nach zweiminütigem Schütteln auf einem Whirlmix wird die organische Phase abgehoben und in einen Spitzkolben überführt. Die wässrige Phase wird mit 5 ml n-Hexan nachextrahiert. Die vereinigte organische Phase (Volumen etwa 13 ml) wird unter Stickstoffstrom im Wasserbad bei etwa 35 °C auf etwa 150 µl eingengt und quantitativ auf die DC-Platte aufgetragen. Die Serumlipide und die Referenzsubstanzen werden mit dem angegebenen Fließmittel entwickelt. Die Zone der freien Fettsäuren wird von der Platte geschabt, und die Fettsäuren werden auf dem Kieselgel 5 Minuten bei 120 °C mit etwa 3 ml Bortrifluorid-Methanol verestert. Der Reaktionslösung werden etwa 4 ml Wasser zugesetzt, um den Bortrifluorid-Diethylether-Komplex zu zerstören. Das so aufgeschwemmte Kieselgel wird über eine Fritte getrocknet, die in einem Saugfinger aufgefangene wässrige Phase mit 3 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die Fettsäuremethylester werden mit 2 × je 5 ml n-Hexan vom Kieselgel eluiert. Die vereinigte Hexanphase wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und in 50 µl n-Hexan aufgenommen.

Gaschromatographische Auftrennung und Auswertung

Unter Zugabe von C_{20:2}-Methylester zur leichteren Identifikation von Eicosatrien- und Arachidonsäure wird 1 µl der Fettsäuremethylesterlösung in die GC-Säule injiziert und mit einem Temperaturprogramm von 100–230 °C bei 2 °C/min entwickelt.

Die Berechnung der Konzentrationen der einzelnen freien Fettsäuren erfolgte über Peakflächenvergleich unter Verwendung eines Autolab Minigrators der Fa. Spectra Physics. Die Konzentrationen der mittelkettigen Fettsäuren (C_{8:0} – C_{12:0}) wurden mit Hilfe des internen Standards C_{9:0} berechnet, die der langkettigen Fettsäuren über den internen Standard C_{17:0}.

Ergebnisse

Richtigkeit

Um die Effizienz des Extraktionsverfahrens zu testen, wurden dem Serum 34,3 µg einer ¹⁴C-markierten Caprylsäure (New England Nuclear, spezifische Aktivität 162,8 MBq/mmol = 4,4 mCi/mmol) zugesetzt. Nach typischem Analysengang wurde die Radioaktivität der aufbereiteten Probe in einem β-Counter gemessen (MR 300 der Fa. Kontron). Es wurden 63,2 ± 6,6% der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden. Mit Hilfe des ebenfalls hinzugefügten internen Standards Pelargonsäure (50 µg) wurde die Menge der eingesetzten radioaktiven Caprylsäure berechnet und dieser Wert mit der Einwaagemenge verglichen. Mit diesem Verfahren wurden 31,7 ± 2,8 µg Caprylsäure (VK = 8,8%) entsprechend einer Wiederfindungsrate von 91,4 ± 5,7% gefunden. Somit ist die Verwendbarkeit des internen Standards C_{9:0} für die

Analyse der mittelkettigen Fettsäuren erwiesen. Daher wurden die weiteren Analysen bzgl. der mittelkettigen Fettsäuren (C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0}) mit dem internen Standard C_{9:0} korrigiert.

Zur weiteren Kontrolle wurde ein Poolserum mit einem Gemisch freier Fettsäuren aufgestockt (Zusammensetzung siehe Tabelle 1; C₁₀, Reinheitsgrad 98%, C₈, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₂₀ Reinheitsgrad 99%, alle für biochemische Zwecke von der Fa. Merck, C₁₉ p.a. von der Fa. Serva, C_{18:1 trans} Reinheitsgrad 99% von der Fa. Sigma). Die Einwaagen und die Wiederfindung für die einzelnen Fettsäuren sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1. Zusammensetzung des dem Poolserum zugesetzten Fettsäuregemischs; Wiederfindungsrate absolut in µg und in % der Einwaage (n = 7).

		Einwaage (µg)	Wiederfindung (µg)	(%)
Caprylsäure	C ₈	46,8	40,8	87,2
Caprinsäure	C ₁₀	54,0	60,9	112,9
Laurinsäure	C ₁₂	56,4	58,9	104,4
Myristinsäure	C ₁₄	56,7	61,1	107,7
Palmitinsäure	C ₁₆	66,7	59,9	89,8
Elaidinsäure	C _{18:1 trans}	48,4	47,4	97,9
Nonadekansäure	C ₁₉	39,0	37,7	96,7
Arachinsäure	C ₂₀	51,8	47,8	92,3

Präzision

Das Poolserum wurde wiederholt aufgearbeitet und für die einzelnen Fettsäuren der Variationskoeffizient der Konzentrationswerte bestimmt (n = 7). Diese Präzisionsbestimmung wurde auch für die zugesetzten Fettsäuren durchgeführt. Die Resultate sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2. Konzentrationen der einzelnen freien Fettsäuren des mit dem Fettsäuregemisch aufgestockten Poolserums ($\bar{x} \pm SD$ in mg/l), Variationskoeffizient in % (n = 7). Angegeben ist die Differenz aus Gesamtkonzentration und Einwaage für C₁₂, C₁₄ und C₁₆.

		Konzentration (mg/l)	VK (%)
Caprylsäure	C ₈	40,8 ± 1,3	3,3
Caprinsäure	C ₁₀	60,9 ± 2,9	4,8
Laurinsäure	C ₁₂	8,0 ± 4,0	50,0
Myristinsäure	C ₁₄	12,9 ± 3,6	28,2
Palmitinsäure	C ₁₆	95,1 ± 11,8	12,4
Palmitoleinsäure	C _{16:1}	10,5 ± 1,0	9,0
Stearinsäure	C ₁₈	34,1 ± 4,6	13,4
Ölsäure	C _{18:1 cis}	96,9 ± 9,7	10,0
Elaidinsäure	C _{18:1 trans}	47,4 ± 2,7	5,7
Linolsäure	C _{18:2}	73,9 ± 4,8	6,5
Linolensäure	C _{18:3}	3,6 ± 0,5	12,8
Nonadekansäure	C ₁₉	37,7 ± 0,9	2,4
Arachinsäure	C ₂₀	47,8 ± 3,1	6,5
Arachidonsäure	C _{20:4}	10,6 ± 1,8	16,9

Ein typisches Chromatogramm der freien Fettsäuren im Serum während eines Infusionsversuches mit mittelkettigen Triglyceriden ist in Abbildung 1 dargestellt. Aus der gaschromatographischen Analyse wird erkennbar, daß Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure, die normaler-

weise den größten Anteil bei den freien Fettsäuren im Serum darstellen (etwa 90%), unter der Infusion von mittelkettigen Triglyceriden auf einen Prozentsatz von etwa 40% reduziert sein können zugunsten der mittelkettigen Fettsäuren Capryl- bzw. Caprinsäure.

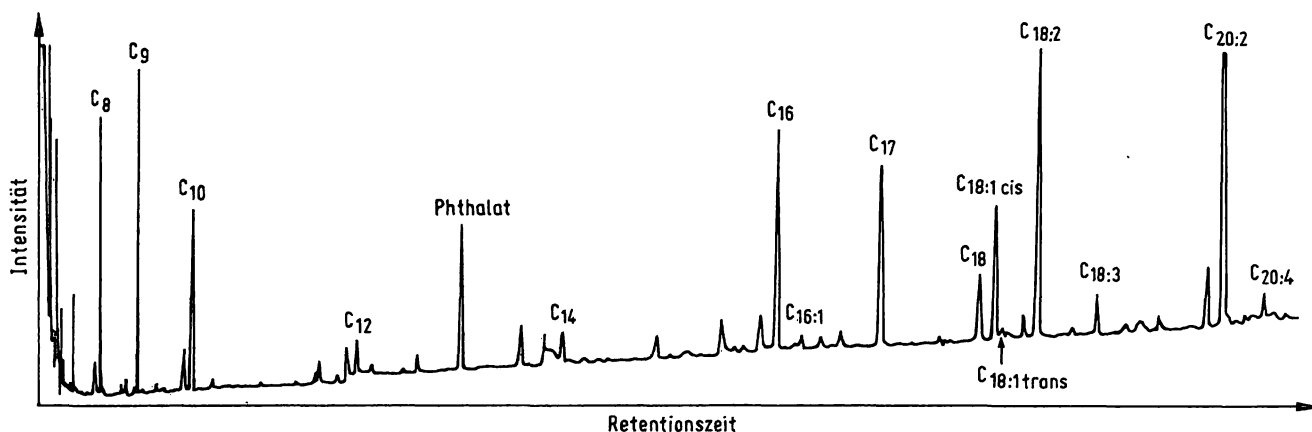


Abb. 1. Typisches Gaschromatogramm der freien Fettsäuren im Serum unter Infusion mittel- und langkettiger Triglyceride; die Fettsäuren liegen als Methyl ester vor.

Diskussion

Die hier vorgestellte Meß- und Probeaufbereitungsmethode hat das Ziel, die freien Fettsäuren des Serums zu erfassen unter Einschluß der mittelkettigen Fettsäuren Capryl-, Caprin- und Laurinsäure.

Die Derivatisierung ist einerseits vollständig, wie auch massenspektrometrische Kontrollen zeigten, und andererseits treten außer bei der Ölsäure keine unerwünschten Nebenreaktionen auf. Die geringe Menge Elaidinsäure lag quantitativ meist unter 1%. Ob dieser Anteil Elaidinsäure tatsächlich auf eine Nebenreaktion zurückzuführen ist, oder ob es sich um präformierte Elaidinsäure handelt, kann nicht beantwortet werden.

Die relativ große Streuung der Werte für Laurin- und Myristinsäure ist durch Verunreinigung aus dem Serum bedingt, die bislang nicht genauer identifiziert werden konnten. Da der Anteil dieser Fettsäuren jedoch unter 5% der gesamten freien Fettsäuren im Serum liegt, konnte auf eine weitere Optimierung der Methode bezüglich dieser beiden Fettsäuren verzichtet werden. Zudem zeigen die Wiederfindungen von 104,4 bzw. 107,7%, daß diese beiden Fettsäuren quantitativ erfaßt werden.

Die untere Nachweisgrenze für freie Fettsäuren mit der beschriebenen Methode kann mit 2 mg/l angegeben werden. Zwar ist eine Peakidentifikation in der Regel noch bei einer Konzentration von 1 mg/l möglich, unterhalb der Grenze von 2 mg/l werden die Streuungen der Meßwerte jedoch zu groß, um verlässliche Werte zu ermöglichen (Streuungen SD > 20%). Besonders berücksichtigt werden muß die Problematik für Laurin- bzw. Myristinsäure.

In der klinischen Routine ist vor allem die Bestimmung der Konzentrationen der langkettigen freien Fettsäuren von Bedeutung. Hierfür, insbes. zur Analyse von großen Probenserien, steht eine Methode zur Verfügung (1). Die von uns vorgestellte Methode ist für derartige Problemstellungen zu zeitaufwendig aufgrund der dünnschichtchromatographischen Vortrennung der Serumlipidfraktionen und wird daher für klinische Studien vorbehalten werden.

Mit der beschriebenen Methode gelang es, die Kinetik der einzelnen freien Fettsäuren im Blut nach Triglyceridinfusionen zu untersuchen.

Literatur

1. Grünert, A. (1975) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 407–412.
2. Olbermann, M. & Grünert, A. (1976) Infusionstherapie 3, 210–214.
3. Sailer, D. & Berg, G. (1979) Infusionstherapie 6, 171–174.
4. Dole, V. & Meinertz, H. (1960) J. Biol. Chem. 235, 2595–2599.
5. Morrison, W. & Smith, L. (1964) J. Lipid Res. 5, 600–608.

Prof. Dr. H. Reinauer
Diabetes-Forschungsinstitut
Auf'm Hennekamp
D-4000 Düsseldorf

